第44卷 第2期
2001年5月
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
Vol.44，No.2
May，2001

粘虫颗粒体病毒增效因子的基因定位

刘 强[1]，叶 寅[2]，白小东[1]，丁 翠[1]*
（1. 中国科学院动物研究所，北京 100080；2. 中国科学院微生物研究所，北京 100080）

摘要：参考粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 颗粒体病毒增强因子的基因序列，设计PCR引物，用PCR反应扩增出特异性产物。用 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶酶切处理PCR反应产物，然后克隆到质粒pUC19中，构建重组质粒pUC19-SF；对重组质粒pUC19-SF中的外源片段测序，结果证明PCR扩增产物是粘虫颗粒体病毒PuGV-Ps增效因子基因的一段序列。重组质粒pUC19-SF的插入片段标记为探针，通过Southern杂交将增效因子基因定位于PuGV-Ps病毒基因组的多种酶切片段上。

关键词：粘虫颗粒体病毒；增效因子；基因定位；Southern杂交
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2001）02-0148-07

杆状病毒增效蛋白是某些杆状病毒编码的活性蛋白质，能促进病毒对敏感细胞的感染过程。研究增效蛋白一方面有助于深入了解病毒的侵染和复制机制；另一方面增效蛋白可以作为微生物杀虫剂的活性添加组分应用于害虫的生物防治。粉纹夜蛾颗粒体病毒（*Trichoplusia ni* granulosis virus，TnGV）编码的病毒增强因子（viral enhancing factor，VEF）基因是第1个克隆、测序的昆虫病毒增效蛋白基因[1]。之后又测序分析了PuGV-SF、HaGV的增效蛋白基因[2]。

用东方粘虫 *Pseudaletia separata* 增殖美洲粘虫颗粒体病毒（*Pseudaletia unipuncta* granulosis virus，夏威夷毒株），得到转寄主的粘虫颗粒体病毒PuGV-Ps。从转寄主颗粒体病毒PuGV-Ps的包涵体总蛋白中分离到增效因子（synergistic factor，SF），我们已经分析了增效因子的生化性质[3]、测定了增效因子的增效活性。但目前对增效因子基因的表达情况研究较少；并且我们注意到在转宿主粘虫颗粒体病毒PuGV-Ps中增效因子在病毒包涵体总蛋白中所占比例较大，高于Tanada报道的5%[4]，从增效蛋白的表达水平推测增效因子基因启动子的活性应该很高。要在转录水平和翻译水平分析增效因子基因的活性，克隆全长的基因序列、分析基因5′端调控区的结构与功能是必需的前期工作。因此作者研究了粘虫颗粒体病毒PuGV-Ps基因组的限制性内切酶酶切图谱，利用Southern杂交对增效因子基因进行定位，为进一步克隆全长的增效因子基因提供了前期工作基础。

1 材料和方法

1.1 细菌、质粒、酶及其它试剂

大肠杆菌菌株TG1、克隆载体pUC19质粒由中国科学院微生物研究所分子病毒学室提

基金项目：微生物资源前期开发国家重点实验室、农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室部分资助
* 通讯作者
收稿日期：1998-12-16；接受日期：1999-03-19

供。内切酶、连接酶（T4 DNA ligase）等分子生物学试剂为华美生物工程公司或 Promega 公司的产品；同位素 α-^{32}P-dCTP 购自 Du Pont 公司；其它化学试剂均为分析纯。

1.2 粘虫颗粒体病毒基因组 DNA 的提取制备

先制备粘虫颗粒体病毒病毒粒子悬液，参考 Smith 和 Summers 的方法[5]提取基因组 DNA。

1.3 PCR 反应

根据已报道的 TnGV 病毒增强因子基因序列[1]，用计算机辅助设计一对引物。上游序列与参照序列相同，下游序列与参照序列互补。引物由中国科学院微生物研究所生物新技术中心用 Oligo 1000M DNA Synthesizer 合成。上游引物序列为 5′CCGAATTCCGCAGAAACTCCTCCAATGTTGC3′，为了下一步克隆方便，在 5′端添加 *Eco*RⅠ酶切位点（序列为 5′GAATTC3′），加保护碱基 CC，其 G+C 含量为 51%，计算退火温度为 70℃；下游引物为 5′CCGACCGCCAGCATCAGCTTTCACG3′，加保护碱基 CC，其 G+C 含量为 60%，计算退火温度为 74℃。PCR 反应条件为：先 94℃变性 4 min，然后依次 94℃变性 1 min、55℃复性 45 秒、72℃延伸 1 min，完成 30 个循环；最后 72℃延伸 10 min。

1.4 核酸样品的酶切、电泳检测

核酸样品酶切反应按常规分子生物学方法进行。0.7%琼脂糖凝胶电泳检测，DNA 分子量标准为 λDNA/*Eco*RⅠ + *Hin*dⅢ。

1.5 重组质粒的构建

PCR 扩增得到的产物先用低熔点琼脂糖胶纯化，用 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶消化，低熔点胶回收纯化约 780 bp 的酶切片段，作为待克隆片段；酶切处理克隆载体 pUC19，进行连接反应；连接反应产物转化感受态细胞 TG1；碱法提取质粒 DNA，取可能是重组质粒的 DNA 样品用 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶酶切，切出的片段与预期大小（783 bp）相符的质粒是重组正确的质粒，命名为质粒 pUC19-SF。

1.6 DNA 序列测定

用 Sanger 双脱氧测序法，对质粒 pUC19-SF 中的插入片段进行测序。由中国科学院微生物研究所生物新技术中心用 Applied Biosystems Model 373A 型 DNA 测序仪完成。

1.7 Southern 杂交

用双酶 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ酶切质粒 pUC19-SF，低熔点胶回收纯化长度为 783 bp 的酶切片段，作为标记反应的模板；探针标记采用 Promega 公司的 Primer-a-Gene® Labeling System 试剂盒。PuGV-Ps 基因组 DNA 酶切、电泳分离后，应用毛细管转移法将酶切片段转移至 Zeta-probe 尼龙膜（Bio-Rad 产品），并用紫外交联固定。62℃预杂交 2 h，然后加入标记探针 55℃水浴杂交12 h，洗膜条件参考 Sambrook 等[6]。

2 实验结果

2.1 PCR 反应、PCR 产物的克隆及酶切鉴定

PCR 反应扩增出一条纯度很高的特异带，与预期的 864 bp 大小一致，PCR 反应的特异性好。PCR 产物经 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切，回收的片段插入到同样用 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ酶切处理的载体 pUC19 中；进一步用 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ酶切鉴定重组质粒，能切下长度为 783 bp

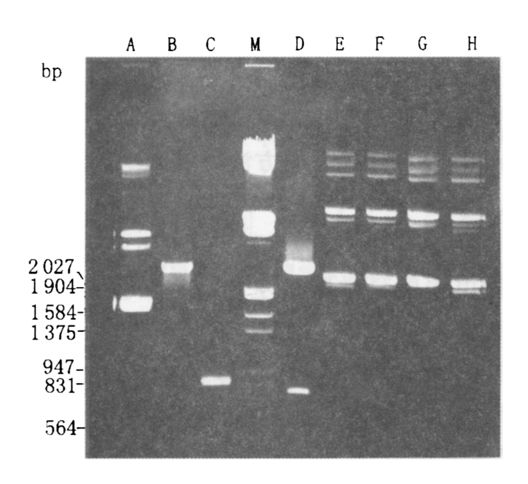


图 1 PCR 产物、重组质粒 pUC19-SF 酶切产物的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoregram of PCR product and pUC19-SF digested by *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ

A. pUC19; B. *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切的 pUC19 pUC19 digested by *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ; C. PCR 产物 PCR product; M. DNA 分子量标准 DNA markers; D. pUC19-SF 的酶切产物 pUC19-SF digested by *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ; E～H. pUC19-SF

的外源片段，从而证明：经酶切处理的 PCR 产物已克隆重组在载体 pUC19 上，得到重组质粒 pUC19-SF。结果见图 1。

2.2 重组质粒 pUC19-SF 的序列测定

用 Sanger 双脱氧链终止测序法测定 pUC19-SF 中外源片段，得到核酸序列。与病毒 TnGV 基因组中病毒增强因子 VEF 的序列[1]比较（图 2），二者的同源性高达 98%。DNA 序列测定的结果充分说明 PCR 产物是粘虫颗粒体病毒 PuGV-Ps 增效因子基因的部分序列。测序的一段包括 -220 nt 至 563 nt，长为 783 bp；其中序列 $^{-8}$ATAAG^{-4} 为杆状病毒基因典型的晚期启动子。

2.3 粘虫颗粒体病毒 PuGV-Ps 基因组 DNA 的限制性内切酶酶切图谱

用 8 种限制性内切酶分别单酶切或双酶切 PuGV-Ps 基因组 DNA，0.7% 琼脂糖凝胶电泳图谱见图 3。PuGV-Ps 基因组酶切产物的电泳图谱中存在亚克分子带（sub-molar band）。

2.4 增效因子基因的定位

以重组质粒 pUC19-SF 的插入片段为模板，利用随机引物标记法制备探针。Southern 杂交结果见图 4。根据杂交带的位置，将增效因子基因定位于 PuGV-Ps 病毒基因组 DNA 酶切片段 *Bam*HⅠ-C、*Eco*RⅠ-H、*Hin*dⅢ-J、*Kpn*Ⅰ-K、*Pst*Ⅰ-I、*Sma*Ⅰ-J、*Xho*Ⅰ-K 上（酶切片段排序时不计亚克分子带）。其中 *Eco*RⅠ-H、*Kpn*Ⅰ-K、*Sma*Ⅰ-J 片段大小较合适，可进一步用于克隆全长的增效因子基因。

3 讨论

在设计实验时，为了克隆 PCR 产物方便，在上游引物 5′端加 *Eco*RⅠ酶切位点；并试图利用 PCR 产物 3′端已有的 *Bam*HⅠ酶切位点（参照 TnGV 基因组中病毒增强因子 VEF 的序列，PCR 产物 3′端应有 *Bam*HⅠ酶切位点）。用 *Eco*RⅠ 、*Bam*HⅠ双酶酶切 PCR 产物，转化感受态菌株 TG1，得到重组质粒 pUC19-SF，说明实验设计合理可行，并且已初步说明 PCR 产物是特异性的目的片段。测序结果更充分地证明 PCR 产物是粘虫颗粒体病毒增效因子基因的一段序列，颗粒体病毒的增效蛋白基因高度保守。

与原始病毒——美洲粘虫颗粒体病毒基因组的酶切图谱[1]（*Hin*dⅢ酶切）相比，转宿主粘虫颗粒体病毒 PuGV-Ps 病毒基因组的酶切图谱存在差异，即转宿主增殖的粘虫颗粒体病毒基因组 DNA 有变异。PuGV-Ps 基因组 DNA 限制性内切酶酶切图谱显示可见的亚克分子带，

-220	GAAACTCCTC	CAATGTTGCA	AGATTTTTTT	ACAAGAGTCA	TTTTGCAGGT
	gaaactcctc	caatgttgca	cgattttttt	acaagagtca	ttttgcacgt
	TTACACGAAA	TTTATTACAA	GATTAGCTGA	TTGTGATAAA	GGTCTGCACG
	ttacaagaaa	tttattacaa	gattagctgc	ttgtgataaa	ggtctgcacg
	AGATGAGATT	CAAATACGTA	ATGAGAATTG	CGTGATTTGC	ACGAGTTTAT
	agatgagatt	caaatacgta	atgagaattg	cgtgatttgc	acgagtttat
	ATAGCATAAT	TTGCTAGGAA	TGTATGTTGG	TTTGTGATGT	TTAGGTGTTC
	atagcataat	ttgctaggaa	tgtctgttgg	tttgtgatgt	ttaggtgttc
	GCTGCATTAA	TTATAAGACT	*ATG*TCGTACA	AAGTGATTGT	ACCCGCTACC
	gctgcattaa	ttataagact	*atg*tcgtaca	aagtgattgt	acccgctacc
	GTGCTACCGC	CGTGGCTCAG	AGTCGGTGAG	AATTGGATAT	TCGCAAGACA
	gtgctaccgc	cgtggctcag	agtcggtgag	aattggatat	tcgcaagaca
	CAGACGCACC	GAGGTGGGAG	TCGTTCTACC	GGCGAACACG	AAATTTCGTG
	cagacgcacc	gaggtgggag	tcgttctacc	ggcgaacacg	aaatttcgtg
	TACGAGCAGA	TTTCTCTAGG	GCGGGCTTCA	CCCGACCCGT	AATAGTGCGC
	tacgagcaga	tttctctagg	gccggcttca	cccgacccgt	aatagtgcgc
	CTCTTGAACA	ACTACCGTAG	CACTGAACGA	GAAATCAACT	TGAACAACGA
	ctcttgaaca	acaaccgtag	cactgaacga	gaaatcaact	tgaacaacga
	CCAATGGATG	GAGGTGGAGC	ATGAGCACGA	AAGTGTGCCG	TTTGTCGATT
	ccaatggatg	gaggtggagc	atgcgcacga	gagtgtgcct	ttcgtagatt
	GGCCGGTGGG	CGAAAAGGAC	ACTATGGTCG	AAGTGTATTT	TGAAATCGAC
	ggctggtggg	cgaaaagaac	actatggccg	aagtgtattt	tgaaatcgac
	GGACCACACA	TACCGCTACC	CGTGTACGTG	TTCAACACGA	GACCCGTCGA
	ggaccacaca	taccgctacc	cgtgtacgtg	ttcaacacga	gacccgtcga
	ACACTTTAAG	AGCGAGTATC	GCCAAAGTTC	GTCTGGCTAC	TGCTTTCTAT
	acactttaag	agcgagtatc	gccaaagttc	gtctggctac	tgctttctat
	ATTTGGACCT	GGTCTGTATG	TTGGTACCGC	CCGTTAGCAA	AAACGCTTTA
	atttggacct	ggtctgtatg	ttggtaccgc	ccgctagcaa	aaacgcttta
	TTGGACGTGA	ACATTTTCGA	GCTTCATCAA	TTTTATAACG	AAATCATTAA
	ttggacgtga	acattttcga	gcttcatcaa	ttttataacg	aaatcattaa
	TTACTATGAT	GACCTGTGCG	GCTTGGTCGA	GGA 563	
	ttactatgat	gacctgtgcg	gcttggtcga	gga	

图 2　粘虫颗粒体病毒 PuGV-Ps 增效因子部分序列与 TnGV VEF 相应序列（小写）的比较

Fig. 2　Partial sequence comparison of the gene of PuGV-Ps synergistic factor with corresponding sequence of TnGV VEF

N 表示有差异的碱基 Shows different bases between the two sequences；*ATG* 为起始密码子 start coden

说明用虫体增殖的转宿主颗粒体病毒 PuGV-Ps 其基因型是不均一的。

与核型多角体病毒相比，在分子水平对颗粒体病毒的研究很少。几种颗粒体病毒的物理图谱已有报道[1,7~14]；目前从颗粒体病毒基因组中鉴定测序的基因有：颗粒体蛋白（granulin）

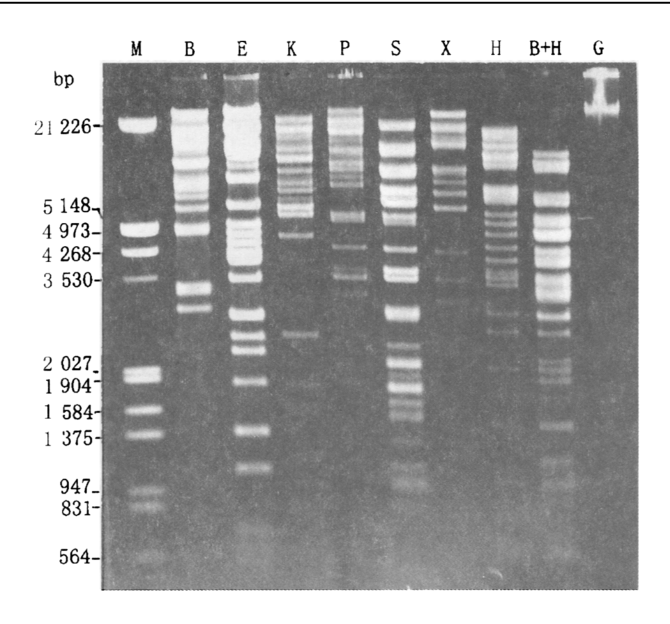


图3 PuGV-Ps病毒基因组DNA的限制性内切酶酶切图谱

Fig. 3 Cleavage patterns of PuGV-Ps genome DNA digested with restriction endonucleases

M. DNA markers; B. *Bam*HⅠ; E. *Eco*RⅠ; H. *Hin*dⅢ; K. *Kpn*Ⅰ; P. *Pst*Ⅰ; S. *Sma*Ⅰ; X. *Xho*Ⅰ; B+H. *BamH*Ⅰ/*Hin*dⅢ; G. PuGV-Ps genome DNA

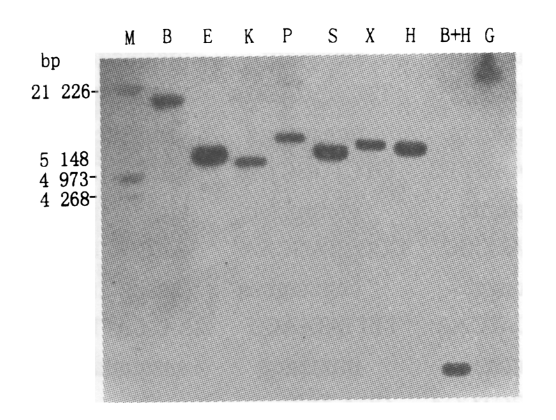


图4 Southern杂交图谱

Fig. 4 Southern blot hybridization and localization of synergistic factor gene

M. DNA markers; B. *Bam*HⅠ; E. *Eco*RⅠ; H. *Hin*dⅢ; K. *Kpn*Ⅰ; P. *Pst*Ⅰ; S. *Sma*Ⅰ; X. *Xho*Ⅰ; B+H. *Bam*HⅠ/*Hin*dⅢ; G. PuGV-Ps genome DNA

基因[14~17]、增效蛋白基因[1,2]、DNA结合蛋白基因[18]、细胞凋亡抑制基因 *iap*[19]、蜕皮甾体糖基转移酶 *egt* 基因[20]以及颗粒体病毒基因组中的同源序列[21]。研究证明颗粒体病毒、核型多角体病毒中相同的保守基因并不多[17]，对颗粒体病毒的功能基因测序，将有助于从分子生物学水平深入研究二种病毒的关系。

尽管粘虫颗粒体病毒PuGV-Ps增效因子的分子量很大（约为108 kD），但其表达量仍较高；蛋白质的表达水平与基因的启动子活性密切相关，因此克隆、测序分析全长的增效因子基因序列，特别是进一步克隆、分析增效因子基因5′端调控区的结构，对于研究在病毒感染过程中增效因子的表达情况具有重要意义。

参 考 文 献 (References)

[1] Hashimoto Y, Corsaro B G, Granados R R. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the *Trichoplusia ni* granulosis virus. J. Gen. Virol., 1991, 72: 2 645~2 651

[2] Roelvink P W, Corsaro B G, Granados R R. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulosis enhancin genes. J. Gen. Virol., 1995, 76: 2 693~2 705

[3] 刘　强, 丁　翠, 蔡秀玉. 粘虫颗粒体病毒增效因子的分离纯化及生化性质. 病毒学报, 1998, 14 (4): 352~358

[4] Tanada Y. A synopsis of studies on the synergistic property of an insect baculovirus: a tribute to Edward A. Steinhaus. J. Invertebr. Pathol., 1985, 45: 125~138

[5] Smith G E, Summers M D. DNA homology among subgroup A, B, and C baculoviruses. Virology, 1982, 123: 393~406

[6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatism T. 分子克隆实验指南, 第 2 版, 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 1993

[7] Crook N E, Spencer R A, Payne C C *et al*. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. J. Gen. Virol., 1985, 66: 2 423~2 430

[8] Dwyer K G, Granados R R. Mapping *Pieris rapae* granulosis virus transcripts and their *in vitro* translation products. J. Virol., 1987, 62: 1 535~1 542

[9] Smith I R L, Crook N E. Physical maps of the genomes of four variants of *Artogeia rapae* granulosis virus. J. Gen. Virol., 1988, 69: 1 741~1 747

[10] Smith I R L, Crook N E. *In vivo* isolation of baculovirus genotypes. Virology, 1988, 166: 240~244

[11] Goto C, Minobe Y, Iizuka T. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genome of granulosis viruses isolated *from Xestia c-nigrum* and five other noctuid species. J. Gen. Virol., 1992, 73: 1 491~1 497

[12] Jehle J A, Backhaus H, Fritsch E *et al*. Physical map of the *Cryptophlebia leucotreta* granulosis virus genome and its relationship to the genome of *Cydia pomonella* granulosis virus. J. Gen. Virol., 1992, 73: 1 621~1 626

[13] Smith I R L, Crook N E. Characterization of new baculovirus genotypes arising from inoculation of *Pieris brassicae* with granulosis viruses. J. Gen. Virol., 1993, 74: 415~424

[14] Crook N E, James J D, Smith I R L *et al*. Comprehensive physical map of the *Cydia pomonella* granulosis virus genome and sequence analysis of the granulin gene region. J. Gen. Virol., 1997, 78: 965~974

[15] Akiyoshi D, Chakerian R, Rohrmann G F *et al*. Cloning and sequencing of the granulin gene from the *Trichoplusia ni* granulosis virus. Virology, 1985, 141: 328~332

[16] Chakerian R, Rohrmann G F, Nesson M H *et al*. The nucleotide sequence of the *Pieris brassicae* granulosis virus granulin gene. J. Gen. Virol., 1985, 66: 1 263~1 269

[17] Jehle J A, Backhaus H. The granulin gene region of *Cryptophlebia leucotreta* granulosis virus: sequence analysis and phylogenetic considerations. J. Gen. Virol., 1994, 75: 3 667~3 671

[18] Jehle J A, Backhaus H. Genome organization of the DNA-binding protein gene region of *Cryptophlebia leucotreta* granulosis virus is closely related to that of nuclear polyhedrosis viruses. J. Gen. Virol., 1994, 75: 1 815~1 820

[19] Crook N E, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting gene with a zinc finger-like motif. J. Virol., 1993, 767: 2 168~2 174

[20] Smith I, Goodale C. Sequence and *in vivo* transcription of *Lacanobia oleracea* granulovirus *egt*. J. Gen. Virol., 1998, 79: 405~413

[21] Hashimoto Y, Hayashi K, Okuno Y *et al*. Physical mapping and identification of interspersed homologous sequences in the *Trichoplusia ni* granulosis virus genome. J. Gen. Virol., 1996, 77: 555~563

Location of the gene encoding synergistic factor of the *Pseudaletia unipuncta* granulosis virus

LIU Qiang[1], YE Yin[2], BAI Xiao-dong[1], DING Cui[1]
(1. Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;
2. Institute of Microbiology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Using the nucleotide sequence of the VEF (viral enhancing factor) gene of *Trichoplusia ni* granulosis virus for reference, we designed a primer for PCR and amplified a specific fragment by PCR reaction. A recombinant plasmid pUC19-SF was constructed by cloning the PCR product which was treated with *Eco*R Ⅰ, *Bam*H Ⅰ into pUC19. The PCR product was proven to be a fragment of the gene encoding the synergistic factor of *Pseudaletia unipuncta* granulosis virus (PuGV-Ps) by DNA sequencing. After labeling this fragment as a probe, the gene encoding of the synergistic factor was located in many restrictive fragments of PuGV-Ps genome by Southern blot hybridization.

Key words: *Pseudaletia unipuncta* granulosis virus; synergistic factor; genetic location; Southern blot hybridization